This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets[5] : C12N 15/55, 9/78, C12Q 1/68 G01N 33/569, A61K 39/106 C12P 21/02

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 90/04030

(43) Date de publication internationale: 19 avril 1990 (19.04.90)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00518

(22) Date de dépôt international: 6 octobre 1989 (06.10.89)

(30) Données relatives à la priorité:
88/13135 6 octobre 1988 (06.10.88) FR

(71) Applicants *(for JP only)*: INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant *(US seulement)* : LABIGNE, Agnès [FR/FR]; 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR).

(74) Mandataire: S.C. ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD; 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: JP, US.

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: SEQUENCES OF NUCLEOTIDES CODING FOR A PROTEIN HAVING AN UREASIC ACTIVITY

(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR UNE PROTEINE A ACTIVITE UREASIQUE

(57) Abstract

The invention relates to a sequence of nucleotides, characterized in that it is comprised of at least one portion of a sequence coding for a protein having a urease activity as expressed by *C. pylori*. The invention also relates to the applications of this sequence, particularly for the *in vitro* diagnosis of pathologies associated with the presence of *Campylobacter pylori* in the organism of an individual.

(57) Abrégé

L'invention concerne une séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée par *C. pylori*. L'invention a également pour objet les applications de cette séquence, notamment pour le diagnostic *in vitro* de pathologies liées à la présence de *Campylobacter pylori* dans l'organisme d'un individu.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR UNE PROTEINE A ACTIVITE UREASIQUE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour une uréase telle qu'exprimée naturellement chez Campylobacter pylori et ses applications biologiques, notamment pour la détection de C.pylori chez l'homme ou dans l'environnement.

C.pylori est une bactérie à gram négatif retrouvée à ce jour exclusivement à la surface de la muqueuse de la partie antrale de l'estomac chez l'homme, et plus particulièrement autour des lésions et des cratères des ulcères gastriques et duodénaux. 25% de la population est porteuse de C.pylori: 8% présentent une maladie ulcéreuse, 9% souffrent de dyspepsie non-ulcéreuse et 8% sont porteurs asymptomatiques.

Tous les C.pylori isolés et décrits à ce jour, possèdent les trois propriétés suivantes:

Les bactéries produisent une uréase dotée d'une grande activité.

Elles adhèrent très fortement aux cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, cette propriété se traduisant in vitro par une très forte adhésion aux cellules Hela.

Les C.pylori produisent et libèrent une enzyme présentant une activité protéolytique conduisant à la dégradation du mucus et donc à un affaiblissement de la barrière naturelle protégeant la muqueuse gastrique.

La détection de C.pylori in situ, chez l'homme et dans l'environnement et l'étude de son pouvoir pathogène - elle est considérée comme responsable des gastrites actives chez l'homme - se heurtent toutefois aux difficultés de culture de cet organisme.

Sa croissance est très lente (6 à 7 jours sur mili u gélosé au sang), et doit s'effectuer dans des conditions de microaérophilie, l'oxygène de l'air étant toxique.

La recherche de moyens de détection de cette bactérie a conduit les inventeurs à identifier les gènes responsables chez C.pylori de la production d'uréase.

La détermination de la séquence de nucléotides d'un fragment intragénique a permis de disposer d'un outil utilisable comme sonde de détection pour l'identification spécifique des C.pylori.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides capables de coder pour des protéines à activité uréasique telles qu'exprimées chez C.pylori.

Elle a également pour but de fournir des fragments de cette séquence utilisables comme sondes de détection de C.pylori.

L'invention vise, en outre, à fournir une protéine à activité uréasique telle qu'exprimée chez C.pylori, de pureté élevée, et des fragments de cette protéine.

La séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori.

L'invention a plus particulièrement pour objet une séquence de nucléotides capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori, dans les conditions suivantes: 68°C, 6 x SSC (1 x SSC est constitué de 0,15M de NaCl et 0,015M de citrate de sodium, pH7), en milieu Denhardt (1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% de sérum albumine de boeuf).

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence de nucléotides est caractérisée en ce qu'elle porte l'information requise pour la production d'une protéine à

activité uréase ou d ses fragments, capables d former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés respectivement contre une protéine d'activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori ou contre des fragments de cette dernière.

La séquence selon l'invention est également caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'un fragment d'environ 8kb correspondant au fragment de restriction EcoRI (ClaI, BamHI)-PstI (HindIII).

La carte de restriction enzymatique de ce fragment est représentée sur la figure 2.

Une séquence plus spécialement préférée comprend au moins une partie d'un fragment d'environ 4,2kb (±5%) délimité par les nucléotides d'extrémité situés respectivement à une distance d'environ 0,55kb en amont du site H2 représenté sur la figure 2, et d'environ 0,7kb en aval du site B1 représenté sur la figure 2.

Les séquences constituées par ce fragment portent l'information nécessaire pour l'expression d'une protéine à activité uréase telle qu'exprimée naturellement chez C.pylori.

L'expression de ces séquences peut intervenir chez tout autre microorganisme capable d'exploiter à son profit l'information portée par ces séquences, notamment chez une souche de Campylobacter naturellement déficiente en gènes codant pour la production d'une protéine à activité uréase (ou encore souche de campylobacter uréase-).

Selon encore un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence présentant:

- l'enchaînement (I) de nucléotides suivant:

AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTTATCAAAAATCTAAAAACGCCCTTTCTTCTCAAGCA
ATTGTCGCTACAAACATGAGCAATTTAGCCCTTAAAGAATACTTAAAATCCCAAGATTTA
GAATTGAAGCATTGCGCGATTGGGGATAAGTTTGTGAGCGAATGCATGCGATTGAACAAA
GCCAATTTTGGAGGCGAGCAAAGCGGGCATATCATTTTTAGCGATTACGCTAAAACCGGC
GATGGCTTGGTGTGCGCTTTGCAAGTGAGCGCGTTAGTGTTAGAAAGTAAGCTT

- ou l'enchaînement (II) de nucléotides suivant:

AACGCATGATTGATTGCAGAAGGAGTGGTGCCCCAGTCTTCGTGAATTTTAAAGCCAATC
GCACCGGCTTCAATTTGATCGGCTAAGCTCGCATCGTTAGAAGCGTTACCTTTAGCCAAG
AAACCTAAATTCATAGAATATTCTTCAGCCGCTCTGAGCATCCATTTTAAATTTCTTCTG
CCTGGAGTGATAGTAGTCGCATTAGTGCCATCAGCAGGACCGGTTCCACCACCAATCATG
GTTGTTACACCGCTTCGAAAAGCTGTAGGGATTTGTTGGGGTGAAATGAAGTGGATGTGT
GTGTCAATACCACCAGCCGTTACGATCAAACCTTCACCGGCTAAGGCTTCAGTAGCAGGA
CCTACGCTAAGATTGTTTTTAACGCCATCTTGCATGTCTTTGTTACCGCCTTTACCAATG
CCAGCGATTTTGCCATCTTTAATACCAATATCCGCTTTATAAATACCGGTGTAATCCACC
ATTAAAGCGTTAGTGATAATTAAATCCAACTCTTCTTTGCTAGGGTTGTTAGATTGGCTC
ATGCCTTCTCTTAGGGGTTTTACCGCCACCGAATTTAAGCTCTTCGCCATAAATGGTGTA
GTCATGTTCTACTTCAGCGATCAAGTCTGATCGCCCAATCTCACTTTATCGCCTGTAGTA
GGACCATACATAGAAACATATTCTTTTCTGCTAATCTTTTTCATTTCTTACTCCTTAATT
GTTTTTACATAGTTGTCATCGCTTTTAGG

ou l'enchaînement (IIbis) d nucléotid s suivant:

CCTAAAAGCGATGACAACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAAGAAATGAAAAAGATTAGC
AGAAAAGAATATGTTCTATGTATGGTCCTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGAT
CAGACTTGATCGCTGAAGTAGAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCG
GTGGCGGTAAAACCCCTAAGAGAAGGCATGAGCCAATCTAACAACCCTAGCAAAGAAGAG
TTGGATTTAATTATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGGTATTTATAAAGCGGAT
ATTGGTATTAAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGTAAAGGCGGTAACAAAGACATGCAA
GATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTAGGTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCCGGTGAAGGT
TTGATCGTAACGGCTGGTGGTATTGACACACACATCCACTTCATTTCACCCCAACAAATC
CCTACAGCTTTTCGAAGCGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGGAACCGGTCCTGCTGAT
GGCACTAATGCGACTACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAAATGGATGCTCAGAGCG
GCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAACGCTTCTAACGATGCG
AGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTGCGATTGGCTTTAAAATTCACGAAGACTGGGGC
ACCACTCCTTCTGCAATCAATCATGCGTT

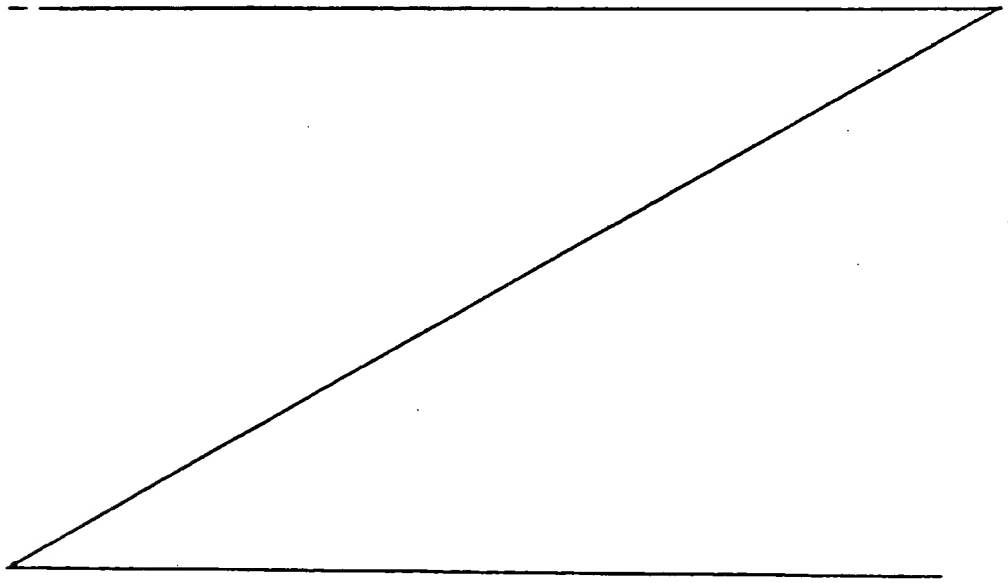
- ou les enchaînements de nucléotides complémentaires respectivement des enchaînements (I) (II) et (IIbis) sus-mentionnés.

Des séquences de nucléotid s sel n l'invention, s nt caractérisées en ce qu'elles comprennent les enchaînements de nucléotides définis ci-dessus ou sont constituées au moins par une partie de ces enchaînements.

Il va de soi que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir de telles séquences donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour la protéine à activité uréase de C.pylori.

Toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements de nucléotides sus-mentionnés telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique, entre également dans le cadre de l'invention.

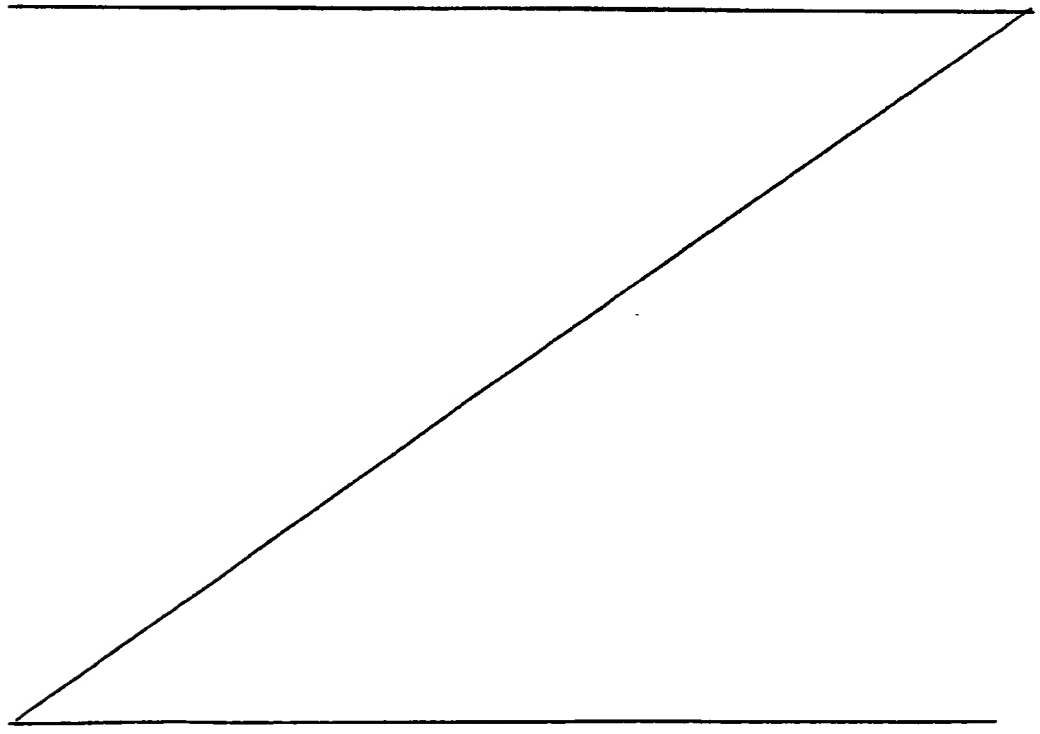
L'invention concerne également une séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à au moins une partie de la séquence (III) en acides aminés suivante:



KLLGVLGVYQKSKNALSSQAIVATNMSNLALKEYLKSQDLELKHCAIGDKFVSEQMRLNK
ANFGGEQSGHIIFSDYAKTGDGLVCALQVSALVLESKL

L'invention a également pour objet une séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à au moins une partie de la séquence en acides aminés (IV) suivante (codée par la séquence nucléotidique (IIbis)

NMTIPFMAKSLNSVAVKPLREGMSQSNNPSKEELDLIITNALIVDYTGIYKADIGIKDGK
IAGIGKGGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPQQIPTAFRSG
VTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRNLKWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIE
AGAIGFKIHEDWGTTPSAINHA



L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage, capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Des vecteurs recombinants préférés renferment au moins une partie de la séquence d'environ 4,2kb évoquée plus haut.

Les souches de micro-organismes transformées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

La souche E.coli S17-1 déposée le 16 Août 1988 sous le n° I-795 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) de l'Institut Pasteur à PARIS (France) porte le plasmide pILL590 de 16,3kb environ qui comprend le fragment de restriction d'environ 8kb EcoRI (ClaI, BamHI)-PstI (Hind III) évoqué plus haut.

L'invention vise en outre une protéine présentant une activité uréase du type de celle exprimée naturellement chez C.pylori ainsi que les fragments peptidiques de cette protéine.

La protéine de l'invention, et ses fragments, correspondent selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides définies ci-dessus, en particulier à au moins une partie de la séquence d'environ 4,2kb.

La protéine de l'invention est également caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées et récupération de la protéin à partir de

ces cellules ou directement à partir du milieu de culture. La production d'uréase ou de fragments de cette dernière par ce procédé, fait également partie de l'invention.

La protéine de l'invention et ses fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement la protéine ci-dessus et ses fragments sont également visés par l'invention.

Les séquences de nucléotides définies ci-dessus sont obtenues selon les techniques classiques du génie génétique par clonage et identification des gènes responsables de la synthèse d'une protéine à activité uréase chez C.pylori.

L'invention vise également les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques, de sondes pour la détection de C.pylori. Cette élaboration comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrin utilisable en tant que sonde.

Les essais réalisés avec de tels fragments pour détecter la présence éventuelle de séquences complémentaires chez divers Campylobacter et chez des microorganismes appartenant à des genres différents ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le génome de C.pylori, entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant l'ADN à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec un échantillon biologique renfermant des bactéries, ou directement avec ces bactéries ou leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit testé.

On peut, par exemple, mettre en oeuvre la méthode d'hybridation sur taches. Cette méthode comporte après dénaturation de l'ADN préalablement obtenu à partir de bactéries provenant de biopsies antrales, le dépôt d'une quantité aliquote de cet ADN sur des membranes de nitrocellulose, l'hybridation de chaque membrane dans les conditions usuelles avec la sonde et la détection, de manière classique, de l'hybride formé.

On peut aussi utiliser un méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Cette méthode

comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles. Il n'est pas toujours nécessaire de procéder à l'expression préalable de l'ADN. Il suffit que l'ADN soit rendu accessible à la sonde.

La détection pour l'identification spécifique des C.pylori peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR). Ces techniques sont décrites en particulier dans les brevets US.4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corporation.

Pour la mise en oeuvre de ces techniques, on utilise deux amorces de 10 à 40 nucléotides, avantageusement d'environ une vingtaine de nucléotides, ces amorces étant comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou susceptibles de s'hybrider avec une partie d'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ou de leurs séquences complémentaires. De manière avantageuse, ces amorces sont distantes d'environ 200 à 250 nucléotides lorsqu'elles sont hybridées (ou liées), aux brins de l'ADN à amplifier. l'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides d'un des brins de fragments d'ADN à amplifier, cette séquence étant située au niveau d'une extrémité de ce fragment (par exemple l'extrémité 5') ; l'autre séquence est capable de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, cette dernière séquence étant située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle sus-mentionnée (cette dernière extrémité étaént encore désignée par extrémité 3' dans l'exemple proposé).

Des amorces préférées sont comprises dans la séquence de nucléotides du fragment de restriction H2-H3

d la figure 2, et sont distantes d' nviron 200 à 250 nucléotides.

Il s'agit, en particulier, des fragments respectivement à chaque extrémité de cette séquence de restriction HindIII-HindIII.

Un procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique comprend les étapes suivantes:

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, par mise en contact de cet échantillon avec des amorces telles que décrites ci-dessus, ces amorces étant susceptibles respectivement de se lier d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides, cette mise en contact étant suivie d'une étape d'amplification génique en présence d'une ADN polymérase et des quatre nucléosides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ces opérations d'hybridation des amorces et d'amplification génique étant répétées plusieurs fois,
- la mise en contact de l'échantillon biologique en question avec une sonde nucléotidique selon l'invention, dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides,
- la détection du complexe d'hybridation.

L'invention fournit ainsi des outils permettant de détecter rapidement C.pylori, in situ, et dans l'environnement avec une grande spécificité, sans avoir à pratiquer de cultures.

De tels outils de détection sont particulièrement utiles pour étudier le réservoir naturel de ces bactéries, les méthodes de transmission, de circulation et de contamination. De plus, dans l diagnostic in vitro

pratiqué sur les biopsies, l'utilisation des sondes permet un gain de temps considérable par rapport aux techniques actuelles qui nécessitent de plus une technologie ne pouvant être réalisée que dans des services spécialisés, à savoir, des techniques bactériologiques ou utilisant la microscopie électronique.

Des résultats reproductibles ont été obtenus en utilisant comme sonde intragénique le fragment d'environ 8kb défini ci-dessus.

Compte tenu de leur spécificité à l'égard de C.pylori, ces sondes constituent également un outil de grand intérêt.

Pour étudier le pouvoir pathogène de C.pylori de façon à prévenir l'infection, il est ainsi possible d'étudier le rôle joué par C.pylori dans le développement des maladies ulcéreuses et d'identifier les déterminants génétiques qui semblent impliqués dans le pouvoir pathogène de cet organisme en vue de créer in vitro des mutants isogéniques de C.pylori, c.a.d. des bactéries modifiées génétiquement dans chacun des déterminants qui semblent jouer un rôle dans la pathogénèse de l'infection, mutants qui pourront être testés dans des modèles animaux.

L'invention concerne également la détection du polymorphisme des gènes codant pour l'uréase chez C.pylori à l'aide des sondes nucléotidiques définies ci-dessus et d'enzymes de restriction appropriées. Les conditions dans lesquelles cette détection est réalisée sont plus particulièrement décrites dans l'article de Gusella J.F. dans J. of Clin. - investigations (1986), 77, 1723-1726.

L'invention vise également les applications immunologiques de la protéine codé, plus spécialement pour l'élaboration d'antisérum spécifique ainsi qu

d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont formés selon les techniques classiques par injection de la protéine à des animaux, récupération des antisérums, puis des anticorps à partir des antisérums par exemple par chromatographie d'affinité.

Les anticorps monoclonaux sont produits de manière habituelle en fusionnant des cellules myélomes avec des cellules de rate d'animaux préalablement immunisés à l'aide des protéines de l'invention.

L'invention vise, en outre, un procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique susceptible de le contenir. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend:

- la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon l'invention, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie de la protéine à activité uréase produite par C.pylori et cet anticorps, et
- la détection du complexe immunologique.

Pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage in vitro, considérées ci-dessus basées sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant:

- le cas échéant, au moins un couple d'amorces selon l'invention,
- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,
- avantageusement, un milieu approprié respectivement à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde.
- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

P ur la mis n oeuvr des méthodes de dépistage in vitro définies ci-dessus, basées sur l'utilisation d'anticorps on aura recours avantageusement à des nécessaires ou kits, comprenant:

- une quantité déterminée d'un anticorps selon l'invention,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie de la protéine à activité uréase produite par une souche de C.pylori et l'anticorps,
- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine à activité uréase et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

Une étude approfondie du fragment de 4,2kb défini ci-dessus a permis de situer les gènes de structure codant pour les sous-unités polypeptidiques majeures de l'uréase de C.pylori.

Cette étude a été réalisée en construisant des mutants dans les plasmides recombinants introduits chez E.coli et C.jejuni incapables de synthétiser l'uréase, (Baskerville-A, Newell D. (1988), Gut.29, 465-472). Le système de transcription-traduction in vitro d'E.coli ainsi qu'un système d'expression en minicellules ont été utilisés afin d'identifier et de localiser, au sein du fragment de 4,2kb de C.pylori, l'ensemble des gènes codant pour les sous-unités de l'uréase: deux protéines majeures de 26kDa et 61kDa ont été identifiées. Parallèlement, après diverses délétions au sein du fragment de 4,2kb, un système de transfert par conjugaison d'une souche d'E.coli à C.jejuni (du type de celui explicité dans la description détaillée qui suit) a été utilisé pour identifier les régions indispensables à l'expressi n de l'activité uréasique et corréler la déléti n d'une région avec la disparition d'un

polypeptide et la perte d l'activité uréasique. Il a été ainsi déterminé que les gènes codant pour les deux polypeptides nécessaires à l'expression de l'activité uréasique se situent dans la région centrale de 03,35kb, en aval du site H3 de la figure 2, et à cheval sur Bl. La transcription des gènes codant pour les polypeptides de 61kDa ou de 26kDa se fait dans le sens EcoRI-PstI. Le fragment de 3,35kb est nécessaire mais non suffisant à l'expression de l'activité uréasique chez C.jejuni. Une région adjacente de 0,85kb, située en amont et apparemment non associée à l'expression de polypeptides chez E.coli, est indispensable à l'expression de l'activité uréasique chez C.jejuni.

L'analyse des mutants de délétion par transcription-traduction in vitro a permis d'observer que les deux polypeptides de 26 et 61kDa sont codés par deux fragments d'ADN adjacents.

La présente invention a pour objet tout ou partie de la séquence nucléotidique (V) suivante :

1

ATGAAACTCACCCCAAAAGAGTTAGATAAGTTGATGCTCCACTACGCTGGAGAATTGGCT

AAAAAACGCAAAGAAAAAGGCATTAAGCTTAACTATGTAGAAGCAGTAGCTTTGATTAGT

GCCCATATTATGGAAGAAGCGAGAGCTGGTAAAAAGACTGCGGCTGAATTGATGCAAGAA

GGGCGCACTCTTTTAAAACCAGATGATGTGATGGATGGCGTGGCAAGCATGATCCATGAA

GTGGGTATTGAAGCGATGTTCCTGATGGGACTAAACTCGTAACCGTGCATACCCCTATT

GAGGCCAATGGTAAATTAGTTCCTGGTGAGTTGTTCTTAAAAAATGAAGACATCACTATC

AACGAAGGCAAAAAAGCCGTTAGCGTGAAAGTTAAAAATGTTGGCGACAGACCGGTTCAA

ATCGGCTCACACTTCCATTTCTTTGAAGTGAATAGATGCCTAGACTTTGACAGAGAAAAA

ACTTTCGGTAAACGCTTAGACATTGCGAGCGGCACAGCGGTAAGATTTGAGCCTGGCGAA

GAAAAATCCGTAGAATTGATTGACATTGCCGGTAACAGAAGAATCTTTGGATTTAACGCA

TTGGTTGATAGACAAGCAGACAACGAAAGCAAAAAAATTGCTTTACACAGAGCTAAAGAG

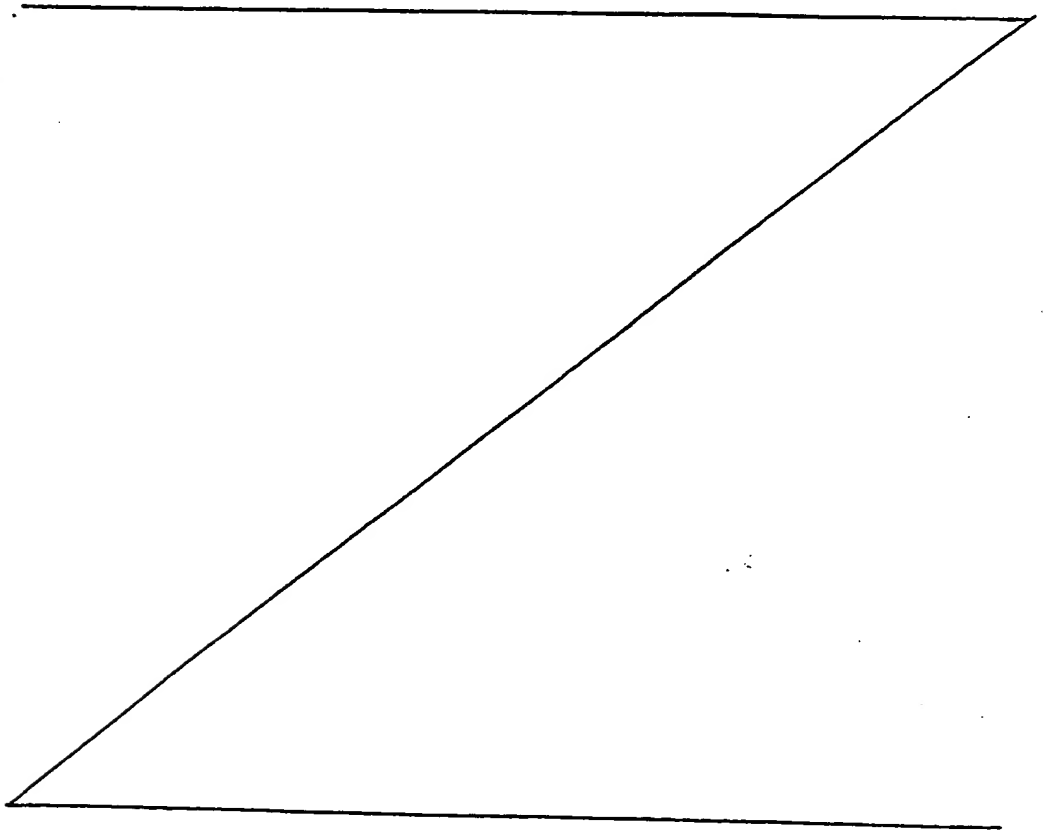
CGTGGTTTTCATGGCGCTAAAAGCGATGACAACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAA

717

L'inventi n a plus particulièrement p ur bjet toute séquence nucléotidique correspondant, selon le code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides animés (VI) de 26kDa (codée par la séquence nucléotidique (V)) suivante:

1
MKLTPKELDKLMLHYAGELAKKRKEKGIKLNYVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE
GRTLLKPDDVMDGVASMIHEVGIEAMFPDGIKLVTVHIPIEANGKLVPGELFLKNEDITI
NEGKKAVSVKVKNVGDRPVQIGSHFHFFEVNRCLDFDREKTFGKRLDIASGTAVRFEPGE
EKSVELIDIGGNRRIFGFNALVDRQADNESKKIALHRAKERGFHGAKSDDNYVKTIKE
239

239 acides aminés
Poids moléculaire : 26.522 daltons



L'invention a également pour objet tout ou partie de la séquence nucléotidique (VII) suivantes:

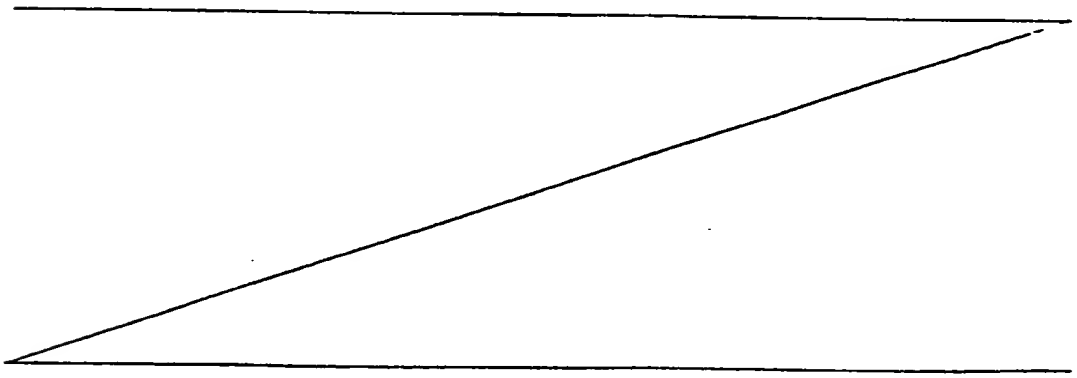
```
1
ATGAAAAAGATTAGCAGAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGTCCTACTACAGGCGATAAA
GTGAGATTGGGCGATACAGACTTGATGCTGAAGTAGAACATGACTACACCATTTATGGC
GAAGAGCTTAAATTCGGTGGCGGTAAAACCCTAAGAGAAGGCATGAGCCAATCTAACAC
CCTAGCAAAGAAGAGTTGGATTTAATTATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGT
ATTTATAAAGCGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATGCTGGCATTGGTAAAGCGGT
AACAAAGACATGCAAGATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTAGGTCCTGCTACTGAAGC
TTAGCCGGTGAAGGTTTGATCGTAACGCCTGGTGGTATTGACACACACATCCACTTCATT
TCACCCCAACAAATCCCTACAGCTTTTGCAAGCGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGGA
ACCGGTCCTGCTGATGGCACTAATGCGACTACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAAA
TGGATGCTCAGAGCGGCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAAC
GCTTCTAACGATCCGAGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTGCGATTGGCTTTAAAATT
CACGAAGACTGGGGCACCACTCCTTCTGCAATCAATCATGCGTTAGATGTTGCGGACAAA
TACGATGTGCAAGTCGCTATCCACACAGACACTTTGAATGAAGCCGGTTGTGTAGAAGAC
ACTATGGCTGCTATTGCTGGACGCACTATGCACACTTTCCACACTGAAGGCGCTGCGGGC
GGACAGGCTCCTGATATTATTAAAGTAGCCGGTGAACACAACATTCTTCCGCTTCCACT
AACCCCACCATCCCTTTCACCGTGAATACAGAAGCAGAGCACATGGACATGCTTATGGTG
TGCCACCACTTGGATAAAAGCATTAAAGAAGATGTTCAGTTCGCTGATTCAAGGATCCGC
CCTCAAACCATTGCGGCTGAAGACACTTGCATGACATGGGGATTTCTCAATCACCAGT
TCTGACTCTCAAGCGATGGGCCGTGTGGGTGAAGTTATCACTAGAACTTGGCAAACAGCT
GACAAAAACAAGAAAGAATTTGGCCGCTTGAAAGAAGAAAAAGGCGATAACGACAACTTC
AGGATCAAACGCTACTTGTCTAAATACACCATTAACCCAGCGATGCCTCATGGATTAGC
GAGTATGTAGGTTCAGTAGAAGTGGGCAAAGTGGCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCA
TTCTTTGGCGTGAAACCCAACATGATCATCAAAGGCGGATTCATTGCGTTAAGCCAAATG
GGCGATGCGAACGCTTCTATCCCTACCCCACAACCGGTTTATTACAGAGAAATGTTCGCT
CATCATGGTAAAGCTAAATACGATGCAAACATCACTTTTGTGTCTCAAGCGGCTTATGAC
AAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGACTTGAAAGACAAGTGTTGCCGGTAAAAAATTGCAGA
AATATCACTAAAAAAGACATGCAATTCAACGACACTACTGCTCACATTGAAGTCAATCCT
GAAACTTACCATGTGTTCGTGGATGGCAAAGAAGTAACTTCTAAACCAGCCAATAAAGTG
AGCTTGGCGCAACTCTTTAGCATTTTCTAG
1710
```

L'invention a plus particulièrement pour bjet tout séquence nucléotidique correspondant, selon le code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides aminés (VIII) de 61kDa (codée par la séquence nucléotidique (VII)) suivante:

I

MKKISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDTDLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLREGM
SQSNNPSKEELDLIITNALIVDYTGIYKADIGIKDGKIAGIGKGGNKDMQDGVKNN
LSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPAD
GTNATTITPGRRNLKWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAIGF
KIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMH
TFHTEGAGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTEAEHMDMLMVCHHLD
KSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSITSSDSQAMGRVGEVITRTWQT
ADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVADL
VLWSPAFFGVKPNMIIKGGFIALSQMGDANASIPTPQPVYYREMFAHHGKAKYD
ANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTAHIEVNPETY
HVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF
569

569 Acides aminés
Poids moléculaire : 61 729 daltons



La comparaison de la séquence en acides aminés VIII avec celle de l'uréase d'haricot (Jack Bean) décrit notamment dans Eur. J. Biochem 175, 151-165 (1588), montre de façon inattendue un haut niveau d'homologies d'acides aminés. Cette conservation de structure a permis aux inventeurs de déduire le site actif de la sous-unité uréasique de 61kDa qui est compris, en totalité ou en partie, dans la séquence polypeptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII décrite ci-dessus.

L'invention vise également toute ou partie de la séquence nucléotidique IX constituée successivement de la séquence V et de la séquence VII.

L'invention se rapporte également à toute séquence nucléotidique correspondant, selon le code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides aminés (X) de 87kDa constituée successivement de la séquence VI et de la séquence VIII.

L'invention concerne également des sondes de détection de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définies ci-dessus.

Il va de soi que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant,
substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir de telles séquences donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour la protéine à activité uréase de C.pylori.

Toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements de nucléotides sus-mentionnés telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN

corr spondant ou encore par synthèse chimiqu , entr également dans le cadre de l'invention.

Toute sonde ne se distiguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le génome de C.pylori, entre dans le cadre de l'invention.

Les sondes sus-mentionnées sont utilisables dans des procédés de diagnostic in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique décrits ci-dessus.

L'invention a également pour objet des amorces nucléotidiques d'environ 10 à environ 40 nucléotides, ces amorces étant comprises dans l'une des séquences nucléotidiques V ou VII définies ci-dessus (ou dans l'une des séquences dérivées de ces séquences V et VII), ou étant susceptibles de s'hybrider avec une partie d'une des séquences nucléotidiques sus-mentionnées ou avec leurs séquences complémentaires (notamment dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus).

L'invention concerne également l'utilisation de ces amorces dans les méthodes de diagnostic in vitro définies ci-dessus, pour l'amplification préalable de la quantité de nucléotides de C.pylori susceptibles d'être contenus dans l'échantillon biologique selon le procédé décrit ci-dessus.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage, capables de transformer une cellule hôte appropriée comportant toute ou partie d'une séquence nucléotidique identique ou dérivée des séquences nucléotidiques V, VII et IX sus-mentionnées.

L'inv ntion vise également un procédé de production de protéines correspondant à toute u parti des

séquences VI, VIII et X sus-mentionnées, ce procédé comprenant la transformation de cellules hôtes appropriées (notamment celles décrites ci-dessus) à l'aide des vecteurs sus-mentionnés et la récupération des protéines ainsi produites suivie, le cas échant, par une étape de purification de ces protéines.

Le procédé de production de protéines défini ci-dessus comprend le cas échéant une étape préalable d'amplification de gène codant pour la protéine dont la production est recherchée, cette étape étant réalisée à l'aide de couples d'amorces de l'invention selon le procédé décrit ci-dessus.

L'invention a également pour objet les polypeptides (ou protéines) codés par les séquences nucléotidiques décrites ci-dessus. En particulier l'invention vise la séquence en acides aminés X de 87kDa, la séquence VI de 26kDa, et la séquence VIII de 61kDa décrites ci-dessus ainsi que leurs fragments.

L'invention concerne également les anticorps polyclonaux et monoclonaux obtenus à partir de toutes ou partie des polypeptides décrits ci-dessus et susceptibles de former un complexe immunologique avec eux.

L'invention vise particulièrement les anticorps, notamment monoclonaux, obtenus à l'aide d'une séquence peptidique d'au moins environ 10 à 15 acides aminés de la séquence VI, ou de la séquence VIII.

Des anticorps monoclonaux préférés de l'invention sont dirigés contre toute ou partie de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, et plus particulièrement ceux obtenus à l'aide d'une séquence peptidique d'au moins environ 10 à 15 acides aminés issue de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquenc VIII.

L'invention a également pour objet l'utilisation des anticorps sus-mentionnés pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic in vitro ainsi que dans des kits de diagnostic in vitro de l'infection d'un individu par C.pylori tels que décrits ci-dessus.

L'invention vise également des compositions immunogènes comprenant toute ou partie des polypeptides décrits ci-dessus, et plus particulièrement, toute ou partie de la séquence polypeptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions immunogènes sont utilisables en tant que compositions de vaccin pour la prévention de l'infection d'un individu par C.pylori.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un (ou plusieurs) anticorps tels que décrits ci-dessus, et plus particulièrement des anticorps susceptibles de former un complexe immunologique avec toute ou partie de la séquence peptidique délimitée par les aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions pharmaceutiques selon l'invention sont utilisables par le traitement des pathologies liées à l'infection d'un individu par C.pylori, notamment des gastrites, et des ulcères gastriques et duodénaux.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention sont rapportés dans la description qui suit concernant le clonage des gènes responsables de la production de la protéine à activité uréase chez C.pylori, le séquençage de la région associée à l'expression de la protéine à activité uréase et la

spécificité de sond s nucléotidiqu s pour la détection d C.pylori.

Dans cette description, on se réfère aux figures 1 et 2 qui représentent:

- la figure 1, la carte de restriction d'un fragment PstI-EcoRI du cosmide recombinant IID2 portant l'information requise pour l'expression de l'uréase chez C.jejuni, et
- la figure 2, la carte de restriction d'un fragment d'environ 8kb de pILL590.

1) Réalisation d'une banque génomique dans un vecteur cosmidique navette; clonage des gènes impliqués dans la production de l'uréase chez C.pylori.

L'ADN chromosomique de la souche C.pylori (85P) est préparé de façon à générer des fragments d'ADN de haut poids moléculaire; environ 300µg de cet ADN chromosomique sont soumis à une digestion partielle contrôlée par l'endonucléase de restriction Sau3A et déposés sur gradient de sucrose de façon à isoler sélectivement des fragments de digestion compris entre 35 et 45 kilobases. 1,5µg de ces fragments sont ligaturés in vitro au vecteur navette-cosmide pILL575 linéarisé par l'endonucléase BamHI et déphosphorylé. pILL575 a été construit à partir du cosmide navette pILL550 décrit par Labigne-Roussel et al. dans J. Bacteriol. 169:5320-5323, 1987, dans lequel a été inséré le site "cos" du phage lambda (fragment Bgl II de 1,7kb de pERG153 inséré au site Pvu II de pILL550); il est donc comme lui mobilisable par conjugaison, code pour une résistance à la kanamycine qui s'exprime à la fois chez E.coli et Campylobacter (Km^r) et se réplique à la fois chez E.coli et chez C.jejuni du fait de la présence de deux origines de réplication, l'une fonctionnelle chez E.coli exclusivement l'autre uniquement chez Campylobacter. Les produits de cett ligation sont empaquetés in vitro dans les particules de lambda puis

introduits par transfection dans une souche de E.coli hébergeant un plasmide IncP capable de complémenter en trans les fonctions de transfert des cosmides recombinants. Les colonies de E.coli infectées et résistantes à la kanamycine sont immédiatement conservées individuellement à -80°C; une banque génomique cosmidique représentative de l'ensemble du génome de Campylobacter pylori est réalisée chez E.coli en conservant environ 500 clones indépendants.

Chacun des cosmides recombinants est alors transféré par conjugaison d'E.coli à une souche réceptrice de Campylobacter jejuni C31, naturellement urease⁻.

On vérifie pour chacun de ces transconjugants résistants à la kanamycine, s'il y a synthèse par Campylobacter jejuni d'une uréase.

On isole un cosmide sur 106 analysés portant une information génétique conférant à Campylobacteur jejuni C31 la capacité de produire une uréase. Le cosmide recombinant (IID2) a une taille de 54 kilobases. La position relative des sites de clivage par les endonucléases de restriction PstI, BamHI, SmaI et EcoRI sur cette séquence est présentée sur la figure 1.

2) Identification du ou des gènes requis pour la production d'uréase chez Campylobacter pylori.

On effectue le sous-clonage des gènes uréases en réalisant à partir de l'ADN cosmidique IID2 préparé chez E.coli des digestions partielles par l'endonucléase Sau3A de façon à générer des fragments de digestions partielles allant de 8 à 15 kilobases. On recherche le plus petit plasmide hybride cloné chez E.coli conférant l'aptitude à produire une uréase après son transfert par conjugaison à Campylobacter récepteur.

4 plasmides sur 37 testés portent l'information nécessaire à l' xpression d l'uréase chez Campylobacter jejuni: pILL586, pILL589 et pILL590 (cf. figure 2).

Par comparaison des cartes de restriction de ces quatre hybrides, on constate la présence d'une séquence de nucléotides de 4,2 kilobases commune aux quatre hybrides, suggérant qu'il s'agit là de la région requise pour l'expression de l'uréase. Un certain nombre de délétions ont été réalisées qui confirme ces conclusions (cf. figure 2).

Le fragment EcoRI-Pst I de pILL590 a été utilisé comme sonde dans des hybridations avec l'ADN total de C.pylori 85P en vue de s'assurer que les différents fragments de restrictions générés avec BamHI et HindIII à partir de pILL590 étaient présents dans 85P. Les résultats obtenus montrent que la séquence de 8kb présente dans pILL590 n'a pas subi de réarrangements au cours des différentes étapes de clonage.

3) Séquence de nucléotides de la région associée à l'expression de l'uréase.

La séquence du fragment HindIII compris entre les sites H2 et H3 correspond à la séquence des 294 nucléotides de l'enchaînement (I).

La séquence suivante de 610 nucléotides de l'enchaînement (II) est interne au fragment défini par les sites H4 et B1 (figure 2).

4) Spécificité des sondes nucléotidiques pour la détection de Campylobacter pylori.

Le fragment EcoRI-PstI de 8kb provenant de pILL590 a été utilisé comme sonde radioactive dans des expériences d'hybridation.

32 Campylobacter pylori ont été testés en hybridation sur colonies et ont donné un signal positif; sur 35 Campylobacter jejuni, fétus et coli étudiés aucune n'a donné de signal positif dans des conditions d'hybridation stringentes classiques (50% de formamide, 37°, 3XSSC).

Dans ces mêmes conditions, la sonde C.pylori de 8 kilobases n'a pas donné de signal positif avec la liste des microorganismes suivants qui sont tous naturellement des producteurs d'uréase:

Klebsiella oxytoca (3 souches), Klebsiella pneumoniae (3 souches), Proteus mirabilis (3 souches) Proteus morganii (3 souches) Proteus vulgaris (2 souches) Providencia stuartii (3 souches), Pseudomonas picketti (3 souches), Yersinia enterocolitica (3 souches), 5 souches d'Acinetobacter uréase$^+$, 2 souches d'Escherichia coli uréase$^+$ et 3 souches de Citrobacter freundii uréase$^+$.

L'absence de faux positif avec le fragment 8kb garantit la spécificité des sondes nucléotidiques proposées.

Un procédé de préparation d'anticorps comprend:
- l'immunisation d'un animal à l'aide d'un polypeptide ci-dessus défini, et
- la récupération des anticorps formés selon les techniques classiques.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques (comportant au maximum 200 nucléotides - ou pb, lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) de l'invention par voie chimique comprend les étapes suivantes:
- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée des bêta-cyanethyl phosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325, 1986,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération des ADN par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides - ou pb (lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes:

- l'assemblage d'olig nucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit dans Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80; 7461-7465, 1983,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

REVENDICATI NS

1. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée par C. pylori.

2. Séquence de nucléotides capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez C. pylori dans les conditions suivantes :68°C, 6 x SSC dans un milieu de Denhardt.

3. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle porte l'information requise pour la production d'une protéine à activité uréase ou de fragments de cette dernière capables de former un complexe immunologique avec des anticorps respectivement contre la protéine à activité uréase telle qu'exprimée par C. pylori, ou contre des fragments de cette dernière.

4. Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment EcoRI(ClaI, BamHI)-PstI(HindIII) d'environ 8 kb dont la carte de restriction enzymatique est représentée sur la figure 2.

5. Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'un fragment d'environ 4,2 kb (± 5 %) délimité par les nucléotides d'extrémité situés respectivement à une distance d'environ 0,55 kb en amont du site H2 représenté sur la figure 1, et d'environ 0,7 kb en aval du site B1 représenté sur la figure 2.

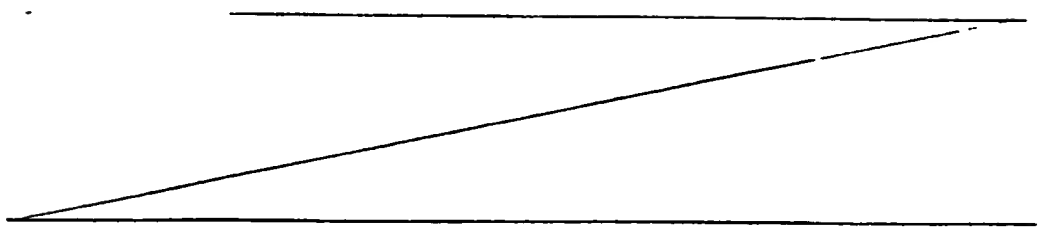
6. Séquence de nucléotides recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, le cas échéant, associée avec un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

7. Séquence de nucléotides, caractérisée en c qu'elle est capable de s'hybrider avec une sonde nucléotidique formée à partir de la séquence présentant:
- l'enchaînement (I) de nucléotides suivant:

AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTTATCAAAAATCTAAAAMGGCCTTTCTTCTCAAGCA
ATTGTCGCTACAAACATGAGCAATTTAGCCCTTAAAGAATACTTAAAATCCCAAGATTTA
GAATTGAAGCATTGCGCGATTGGGGATAAGTTTGTGAGCGAATGCATGCGATTGAACAAA
GCCAATTTTGGAGGCGAGCAAAGCGGGCATATCATTTTTAGCGATTACGCTAAAACCGGC
GATGGCTTGGTGTGCGCTTTGCAAGTGAGCGCGTTAGTGTTAGAAAGTAAGCTT

- ou l'enchaînement (IIbis) de nucléotides suivant:

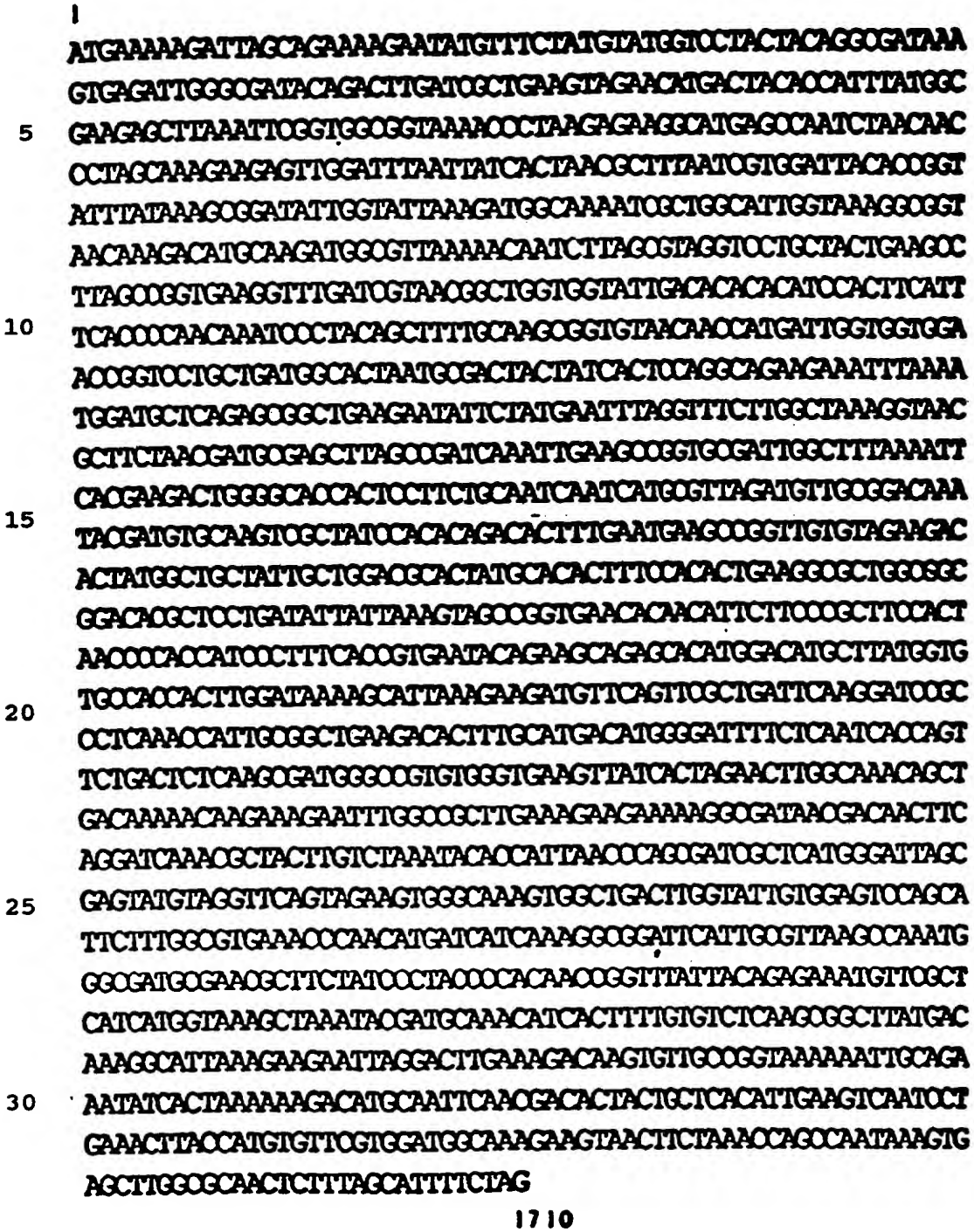
CCTAAAAGCGATGACAACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAAGAAATGAAAAAGATTAGC
AGAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGTCCTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGAT
CAGACTTGATCGCTGAAGTAGAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCG
GTGGCGGTAAAACCCCTAAGAGAAGGCATGAGCCAATCTAACAACCCTAGCAAAGAAGAG
TTGGATTTAATTATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGGTATTTATAAAGCGGAT
ATTGGTATTAAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGTAAAGCGGGTAACAAAGACATGCAA
GATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTAGGTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCCGGTGAAGGT
TTGATCGTAACGGCTGGTGGTATTGACACACACATCCACTTCATTTCACCCCAACAAATC
CCTACAGCTTTTCGAAGCGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGGAACCGGTCCTGCTGAT
GGCACTAATGCGACTACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAAATGGATGCTCAGAGCG
GCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAACGCTTCTAACGATGCG
AGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTGCGATTGGCTTTAAAATTCACGAAGACTGGGGC
ACCACTCCTTCTGCAATCAATCATGCGTT



- ou l' nchaînement (V) de nucléotid s suivant:

1
ATGAAACTCACCCCAAAAGAGTTAGATAAGTTGATGCTCCACTACGCTGGAGAATTGGCT
AAAAAACGCAAAGAAAAAGGCATTAAGCTTAACTATGTAGAGCAGTAGCTTTGATTAGT
GCCCATATTATGGAAGAAGCGAGAGCTGGTAAAAAGACTGCGGCTGAATTGATGCAAGAA
GGCGCCACTCTTTTAAAACCAGATGATGTGATGGATGGCGTGGCAAGCATGATCCATGAA
GTCGGTATTGAAGCGATGTTTCCTGATGGGACTAAACTGGTAACCGTGCATACCCCTATT
GAGGCCAATGGTAAATTAGTTCCTGGTGAGTTGTTCTTAAAAAATGAAGACATCACTATC
AACGAAGGCAAAAAAGCCGTTAGCGTGAAAGTTAAAATGTTGCGACAGACCGGTTCAA
ATGGCTCACACTTCCATTTCTTTGAAGTGAATAGATGCCTAGACTTTGACAGAGAAAA
ACTTTCGGTAAACGCTTAGACATTGCGAGCGGGACAGCGGTAGATTTGAGCCTGCGCAA
GAAAAATCCGTAGAATTGATTGACATTGCGGGTAACAGAAGATCTTTGGATTTAACGCA
TTGGTTGATAGACAAGCAGACAACGAAGCAAAAAAATTGCTTTACACAGAGCTAAAGAG
CGTGGTTTTCATGGCGCTAAAAGCGATGACAACTATGTAAAACAATTAAGGAGTAA

- ou l'enchaînement (VII) de nuclé tides suivant:



- u les enchaînements de nucléotides complémentaires respectivement des enchaînements (I) (II) (V) et (VII) sus-mentionnés.

8. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend un enchaînement de nucléotides selon la revendication 7 ou qu'elle est constituée par au moins une partie de cet enchaînement.

9. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (III) en acides aminés suivante:

KLLGVLGVYQKSKNALSSQAIVAINMSNLALKEYLKSQDLELKHCAIGDKFVSEQMRLNK
ANFGGEQSGHIIFSDYAKTGDGLVCALQVSALVLESKL

10. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (IV) en acides aminés suivante:

NMITPFMAKSLNSVAVKPLREGMSQSNNPSKEELDLIITNALIVDYTGIYKADIGIKDGK
IAGIGKGGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPQQIPTAFRSG
VTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRNLKWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIE
AGAIGFKIHEDWGTTPSAINHA

11. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (VI) en acides aminés suivante:

MKLIPKELDKIMLHYAGELAKKRKEKGIKLNYVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE
GRTLLKPDDVMDGVASMIHEVGIEAMFPDGIKLVTVHIPIEANGKLVPGELFLKNEDITI
NEGKKAVSVKVKNVGDRPVQIGSHFHFFEVNRCLDFDREKIFGKRLDIASGTAVRFEPGE
EKSVELIDIGGNRRIFGFNALVDRQADNESKKIALHRAKERGFHGAKSDDNYVKTIKE
239

12. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (VIII) en acides aminés suivante:

MKKISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDTDLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLREGM
SQSNNPSKEELDLIITNALIVDYTGIYKADIGIKDGKIAGIGKGGNKDMQDGVKNN
LSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPAD
GTNATTITPGRRNLKWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAIGF
KIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMH
TFHTEGAGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTEAEHMDMLMVCHHLD
KSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSITSSDSQAMGRVGEVITRTWQT
ADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVADL
VLWSPAFFGVKPNMIIKGGFIALSQMGDANASIPTPQPVYYREMFAHHGKAKYD
ANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTAHIEVNPETY
HVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF
569

13. Vecteur recombinant, notamment plasmide ou cosmide recombinant, capable de transformer une cellule hôte appropriée, ledit vecteur contenant une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant l'expression de ce fragment dans la cellule hôte.

14. Plasmide pILL590 porté par la souche E.coli S17-1 déposée le 16 août 1988 sous le numéro I-795 à la C.N.C.M.

15. Souche de micro-organisme transformée à l'aide d'au moins un vecteur selon la revendication 13 ou 14 ou d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

16. Protéine à activité uréase du type de celle exprimée chez C.pylori et ses fragments peptidiques, correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

17. Protéine à activité uréase du type de celle exprimée chez C.pylori, telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant selon la revendication 13 ou 14, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées et récupération de l'uréase à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

18. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre toute ou partie de la protéine, ou de ses fragments, selon la revendication 16 ou 17.

19. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre toute ou partie de la séquence déterminée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII selon la revendication 12.

20. Sonde de détection caractérisée en ce qu'ell comprend tout ou partie des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

21. Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon susceptible de le contenir, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces suceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,
- la mise en contact de l'échantillon biologique susmentionné avec une sonde nucléotidique selon la revendication 20, dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,
- la détection du susdit complexe d'hybridation.

22. Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique susceptible de le contenir, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 18 ou 19, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie de la protéine à activité uréase produite par C.pylori et cet anticorps, et
- la détection du complexe immunologique.

23. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:

- un quantité déterminé d'un sonde nuclé tidiqu sel n la revendication 20,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde sus-mentionnée,
- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

24. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:
- une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 18 ou 19,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine à activité uréase produite par une souche de C.pylori et l'anticorps,
- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine uréase et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

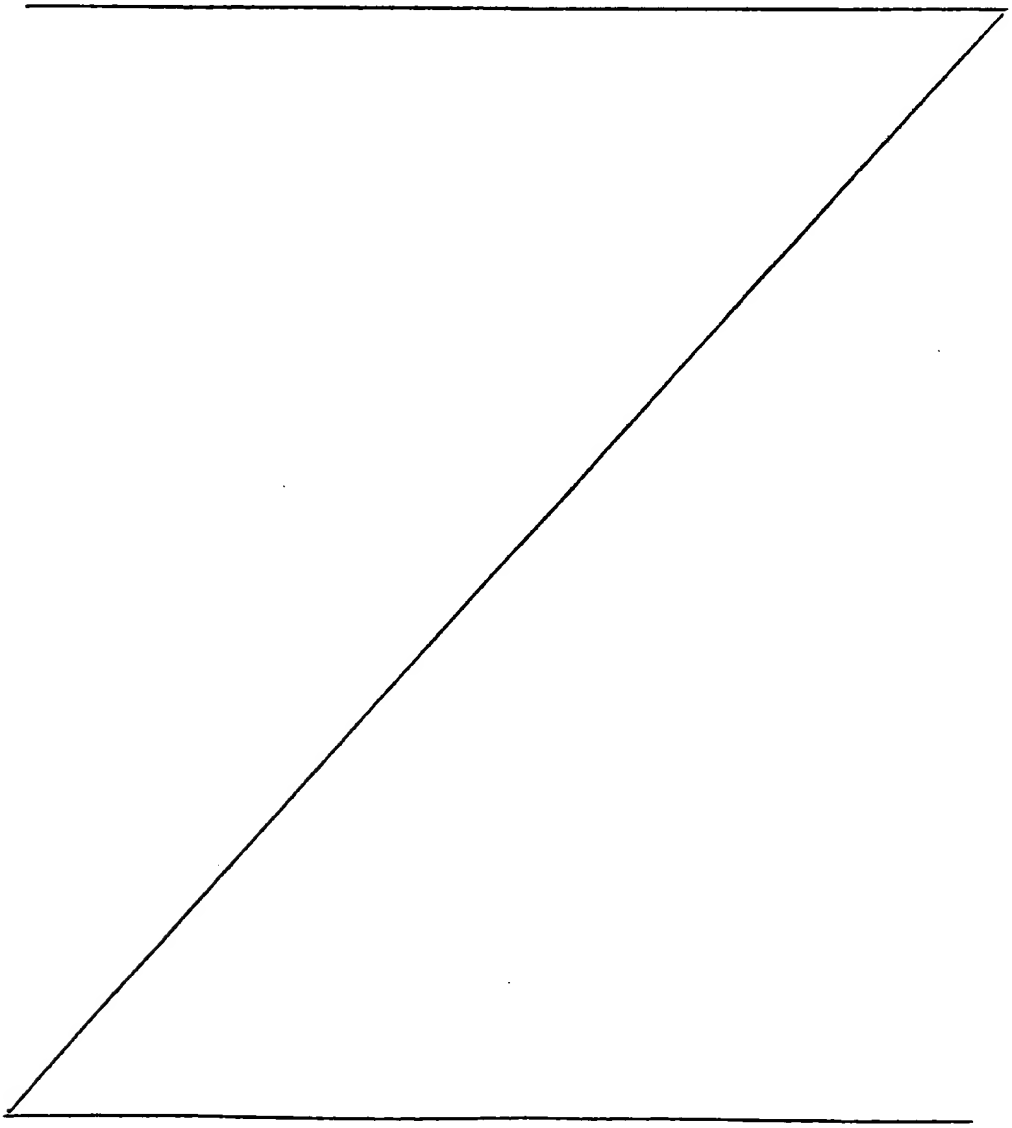
25. Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux séquences de nucléotides d'environ au moins 20 nucléotides, compris dans l'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

26. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des antic rps selon la revendication 18

ou 19 en association avec un véhicul ph&rmaceutiquement acceptable.

27. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend toute ou partie d'une protéine selon la revendication 16 ou la revendication 17 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

28. Composition selon la revendication 27 caractérisé en ce qu'elle comprend toute ou partie de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII selon la revendication 12.



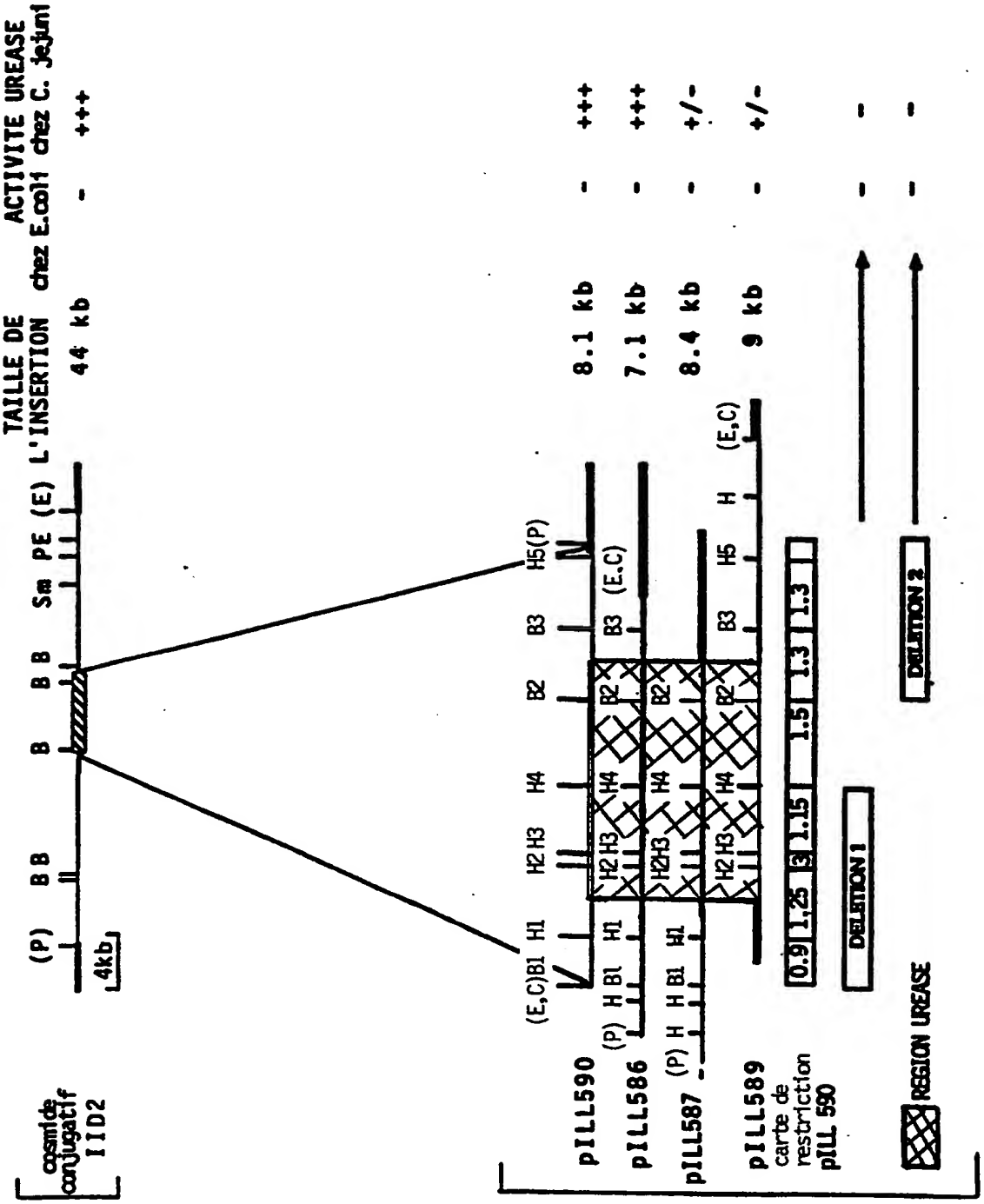


Figure 1

Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 89/00518

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.[5]: C 12 N 15/55, C 12 N 9/78, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/569, A 61 K 39/106, C 12 P 21/02

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.[5]:	C 12 N 15/55, C 12 N 9/78, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/569, A 61 K 39/106

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category [10]	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
Y	Chemical Abstracts, vol. 109, No: 7, 15 August 1988, (Columbus, Ohio, US), H.L.T. Mobley et al.: "Characterization of urease from Campylobacter pylori" see page 289, abstract 50580d & J. Clin. Microbiol. 1988, 26 (5), 831-6	1,9-12,17-24, 26-28
X		16
	-.-	
Y	WO, A, 86/04422 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 31 July 1986, see the whole document	1,9-12,17,20, 21,23
	-.-	
Y	WO, A, 87/01119 (WINN) 26 February 1987, see the whole document	18,19,22,24
A		26-28
	-.-	
A	Journal of Bacteriology, vol. 169, No: 11, November 1987, American Society for Microbiology (Baltimore, US), A. Labigne-Roussel et al.: "Gene transfer from Escherichia coli to Campylobacter species: development of shuttle vectors for genetic analysis of Campylobacter jejuni", pages 5320-5323, see the whole article (cited in the application)	13-15
	-.-	

./.

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
22 December 1989 (22.12.89)	12 February 1990 (12.02.90)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
European Patent Office	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Chemical Abstracts, vol. 108, No: 19, 9 May 1988, (Columbus, Ohio, US), S.I.H. Majewski et al.: "Restriction endonuclease analysis of the genome of Campylobacter pylori with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation", see abstract 164225b & J. Infect. Dis. 1988, 157(3), 465-71	1,2,4,5
A	EP, A, 0200362 (CETUS CORP.) 5 November 1986, see abstract; column 10, line 48 - column 11, line 14; column 26, lines 9-22; column 28, lines 11-29; column 46; example 11; claims	25
A	EP, A, 0204438 (B.J. Marshall) 10 December 1986, see the whole document	16,21-24
A	Journal of Medical Microbiology, vol. 27, No: 1, 1988. The Pathological Soc. of Great Britain & Ireland (Edinburgh, GB) R.L. Ferrero et al.: "The urease enzymes of Campylobacter pylori and a related bacterium", pages 33-40, see abstract; page 35, column 1; page 36, columns 1,2; page 39, columns 1,2	1,16-19,22, 24,26-28
P,X	Chemical Abstracts, vol. 110, No: 13, 27 March 1989, (Columbus, Ohio, US). C.L. Clayton et al.: "Molecular cloning and expression of Campylobacter pylori species-specific antigens in Escherichia coli K-12", see page 199, abstract 109392v, & Infect. Immun. 1989, 57(2), 623-9	1-3,13,15-19, 22,24

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 8900518 SA 31901

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/02/90
The European Patent ffice is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8604422	31-07-86	US-A-	4785086	15-11-88
		EP-A-	0208772	21-01-87
WO-A- 8701119	26-02-87	AU-A-	6282786	10-03-87
		EP-A-	0233261	26-08-87
EP-A- 0200362	05-11-86	US-A-	4683202	28-07-87
		US-A-	4683195	28-07-87
		AU-B-	586233	06-07-89
		AU-A-	5532286	02-10-86
		AU-A-	5532386	02-10-86
		CA-A-	1237685	07-06-88
		EP-A-	0201184	12-11-86
		JP-A-	62000281	06-01-87
		JP-A-	61274697	04-12-86
		US-A-	4800159	24-01-89
EP-A- 0204438	10-12-86	US-A-	4748113	31-05-88
		JP-A-	62026000	03-02-87

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 89/00518

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) [7]

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB[5] : C 12 N 15/55, C 12 N 9/78, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/5.69, A 61 K 39/106, C 12 P 21/02

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée [8]

Système de classification	Symboles de classification
CIB[5]	C 12 N 15/55, C 12 N 9/78, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/569, A 61 K 39/106

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté [9]

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS [10]

Catégorie *	Identification des documents cités,[11] avec indication, si nécessaire, des passages pertinents [12]	N° des revendications visées [13]
Y	Chemical Abstracts, vol. 109, no. 7, 15 août 1988, (Columbus, Ohio, US), H.L.T. Mobley et al.: "Characterization of urease from Campylobacter pylori" voir page 289, résumé 50580d & J. Clin. Microbiol. 1988, 26(5), 831-6	1,9-12,17-24,26-28
X	--	16
Y	WO, A, 86/04422 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 31 juillet 1986, voir le document en entier	1,9-12,17, 20,21,23
Y	-- WO, A, 87/01119 (WINN) 26 février 1987, voir le document en entier	18,19,22,24
A	--	26-28
A	Journal of Bacteriology, vol. 169, no. 11, novembre 1987, American Soc. for Microbiology (Baltimore, US) A. Labigne-Roussel et al.: "Gene transfer	13-15

./.

* Catégories spéciales de documents cités: [11]

«A» document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

«E» document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

«L» document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

«O» document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

«P» document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

«T» document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

«X» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

«Y» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

«&» document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
22 décembre 1989	12 FEB 1990
Administration chargée de la recherche internationale	**Signature du fonctionnaire autorisé**
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	L. ROSSI

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS C MME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	from Escherichia coli to Campylobacter species: development of shuttle vectors for genetic analysis of Campylobacter jejuni", pages 5320-5323 voir l'article en entier (cité dans la demande)	
A	Chemical Abstracts, vol. 108, no. 19, 9 mai 1988, (Columbus, Ohio, US), S.I.H. Majewski et al.: "Restriction endonuclease analysis of the genome of Campylobacter pylori with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation", voir résumé 164225b & J. Infect. Dis. 1988, 157(3), 465-71	1,2,4,5
A	EP, A, 0200362 (CETUS CORP.) 5 novembre 1986, voir résumé; colonne 10, ligne 48 - colonne 11, ligne 14; colonne 26, lignes 9-22; colonne 28, lignes 11-29; colonne 46; example 11; revendications	25
A	EP, A, 0204438 (B.J. MARSHALL) 10 décembre 1986, voir le document en entier	16,21-24
A	Journal of Medical Microbiology, vol. 27, no. 1, 1988 The Pathological Soc. of Great Britain & Ireland (Edinburgh, GB) R.L. Ferrero et al.: "The urease enzymes of Campylobacter pylori and a related bacterium" pages 33-40, voir résumé; page 35, colonne 1; page 36, colonnes 1,2; page 39, colones 1,2	1,16-19,22, 24,26-28
P,X	Chemical Abstracts, vol. 110, no. 13, 27 mars 1989, (Columbus, Ohio, US) C.L. Clayton et al.: "Molecular cloning and expression of Campylobacter pylori species-specific antigens in Escherichia coli K-12", voir page 199, résumé 109392v, & Infect. Immun. 1989, 57(2), 623-9	1-3,13,15-19, 22,24

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 8900518
SA 31901

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 05/02/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A- 8604422	31-07-86	US-A-	4785086	15-11-88
		EP-A-	0208772	21-01-87
WO-A- 8701119	26-02-87	AU-A-	6282786	10-03-87
		EP-A-	0233261	26-08-87
EP-A- 0200362	05-11-86	US-A-	4683202	28-07-87
		US-A-	4683195	28-07-87
		AU-B-	586233	06-07-89
		AU-A-	5532286	02-10-86
		AU-A-	5532386	02-10-86
		CA-A-	1237685	07-06-88
		EP-A-	0201184	12-11-86
		JP-A-	62000281	06-01-87
		JP-A-	61274697	04-12-86
		US-A-	4800159	24-01-89
EP-A- 0204438	10-12-86	US-A-	4748113	31-05-88
		JP-A-	62026000	03-02-87

EPO FORM P0472